



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/543 (2020.02); G01N 33/5438 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019108681, 26.03.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.03.2019Дата регистрации:
08.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.03.2019

(43) Дата публикации заявки: 28.09.2020 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 08.10.2020 Бюл. № 28

Адрес для переписки:

620002, Свердловская обл., г. Екатеринбург, ул.
Мира, 19, Центр интеллектуальной
собственности, Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):

Свалова Татьяна Сергеевна (RU),
Медведева Маргарита Вадимовна (RU),
Малышева Наталья Николаевна (RU),
Сайгушкина Анна Александровна (RU),
Козицина Алиса Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Уральский федеральный
университет имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2249818 C2, 10.04.2005. LIN P.-C.
et al. Site-specific Protein Modification Through
Cu(I)-catalyzed 1,2,3-triazole Formation and Its
Implementation in Protein Microarray
Fabrication. Angew Chem Int Ed Engl. 2006 Jun
26; 45(26): 4286-90. MEINI N. et al. Label-free
Electrochemical Monitoring of Protein
Addressing Through Electroactivated "Click"
(см. прод.)

(54) СПОСОБ АДРЕСНОЙ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ НА ПОВЕРХНОСТИ РАБОЧЕГО ЭЛЕКТРОДА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Предложен способ адресной ковалентной иммобилизации белков на поверхности углеродсодержащего рабочего электрода, характеризующийся погружением электрода в электрохимическую ячейку, содержащую 25%-ный раствор винилбензилазида в диметилформамиде, наложением шести циклических разверток потенциала в диапазоне

-0,5 В до -3 В для формирования на электроде пленки поливинилбензилазида, электрохимическим осаждением частиц Cu^0 в пленку поливинилбензилазида из раствора соли меди (II) и инкубированием электрода в водной суспензии белка в течение 30 минут. Изобретение обеспечивает сокращение длительности процедуры иммобилизации. 2 з.п. ф-лы, 2 пр., 2 ил.

(56) (продолжение):

Chemistry on Gold Electrodes. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014 May 1; 38: 286-91. WANG Y. et al. Voltammetric myoglobin sensor based on a glassy carbon electrode modified with a composite film consisting of carbon nanotubes and a molecularly imprinted polymerized ionic liquid. Microchim Acta. 2017; 184: 195-202.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/543 (2020.02); G01N 33/5438 (2020.02)(21)(22) Application: **2019108681, 26.03.2019**(24) Effective date for property rights:
26.03.2019Registration date:
08.10.2020

Priority:

(22) Date of filing: **26.03.2019**(43) Application published: **28.09.2020 Bull. № 28**(45) Date of publication: **08.10.2020 Bull. № 28**

Mail address:

**620002, Sverdlovskaya obl., g. Ekaterinburg, ul.
Mira, 19, Tsentr intellektualnoj sobstvennosti,
Marks T.V.**

(72) Inventor(s):

**Svalova Tatyana Sergeevna (RU),
Medvedeva Margarita Vadimovna (RU),
Malysheva Natalya Nikolaevna (RU),
Sajgushkina Anna Aleksandrovna (RU),
Kozitsina Alisa Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal State Autonomous Educational
Institution of Higher Education Ural Federal
University named after the first President of
Russia B.N.Yeltsin (RU)**(54) **METHOD FOR TARGETED COVALENT IMMOBILISATION OF PROTEINS ON SURFACE OF WORKING ELECTRODE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine. Disclosed is a method for targeted covalent immobilisation of proteins on the surface of a carbon-containing working electrode, characterized by immersing the electrode in an electrochemical cell containing 25 % vinylbenzyl azide in dimethylformamide, applying six cyclic sweeps of the potential in the range of -0.5 V to -3 V to form a

polyvinylbenzylazide film on the electrode, electrochemical deposition of Cu⁰ particles into a polyvinylbenzyl azide film from a copper (II) solution and incubating the electrode in an aqueous protein suspension for 30 minutes.

EFFECT: invention provides reduced duration of immobilization procedure.

3 cl, 2 ex, 2 dwg

Изобретение относится к способам иммобилизации рецепторного слоя электрохимических биосенсоров. Изобретение создано с целью совершенствования конструкций современных электрохимических биосенсоров, а именно: сокращения временных, материало- и трудозатрат, миниатюризации и автоматизации. Изобретение
5 может быть использовано в микробиологии, биотехнологии, медицине, технологии изготовления биосенсорных устройств.

Известен способ ковалентной иммобилизации белковых молекул на поверхность предметного стекла посредством реакции CuAAC [P.-C. Lin, S.-H. Ueng, M.-C. Tseng, J.-L. Ko, K.-T. Huang, S.-C. Yu, A. K. Adak, Y.-J. Chen, C.-C. Lin / Site-Specific Protein
10 Modification through CuI-Catalyzed 1,2,3-Triazole Formation and Its Implementation in Protein Microarray Fabrication// Angew. Chem. Int. Ed. 45 (2006) 4286-4290]. Предметное стекло функционировало азидными группами, после чего проводили реакцию CuAAC катализируемую системой "CuSO₄-трис(карбоксиэтил)-фосфин" с алкин-
функционализированными белками, в течение 12 часов.

Описан метод [E. Sánchez-Tirado, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón / Carbon nanotubes functionalized by click chemistry as scaffolds for the preparation of electrochemical immunosensors. Application to the determination of TGF-beta 1 cytokine // Analyst 14 (2016) 5730-5737] к иммобилизации антител на рабочий электрод посредством CuAAC реакции на поверхности азид-функционализированных углеродных нанотрубок.
20 CuAAC реакция протекала в объеме суспензии, содержащей предварительно синтезированные конъюгаты антител с пропаргил-N-гидроксисукцинимидом, после чего на рабочий электрод капали нанотрубки с иммобилизованными антителами. В качестве катализатора авторы применяли систему "CuSO₄-аскорбиновая кислота",
время реакции составляло 12 часов.

Известен способ адресной иммобилизации белков на поверхности силиконового носителя с использованием реакции CuAAC [T. Vrankena, E. S. Redeker, A. Misztal, B. Billena, W. Hermens, B. de Laat, P. Adriaenssens, W. Guedens, T. J. Cleij / In situ monitoring and optimization of CuAAC-mediated protein functionalization of biosurfaces // Sensors and Actuators B 238 (2017) 992–1000]. В предложенном способе поверхность
30 карбоксилированной силиконовой подложки модифицировали азидным линкером, белковую молекулу алкилировали эфиром N-гидроксисукцинимидом. После этого между азидной группой функционализированной подложки и ацетиленфункционализированным белком проводили реакцию CuAAC, катализируемую системой "CuSO₄-аскорбат натрия".

Общее время иммобилизации превышало 4 часа.

Также известен метод [N. Meini, M. Ripert, C. Chaix, C. Farre, G. De Crozals, R. Kherrat, N. Jaffrezic-Renault / Label-free electrochemical monitoring of protein addressing through electroactivated "click" chemistry on gold electrodes // Materials Science and Engineering C 38 (2014) 286–291] адресной иммобилизации стрептавидина на поверхности золотого электрода. Поверхность электрода модифицировали гексинил-терминальным дитиол
40 фосфорамидитом, после чего между ацетиленовой группой данного соединения и предварительно синтезированным конъюгатом «азид-полиэтиленгликоль-биотин» проводили клик-реакцию, катализируемую ионами меди Cu(I), электрогенерируемыми из раствора CuSO₄. Далее модифицированный рабочий электрод инкубировали в
45 суспензии стрептавидина. Общее время иммобилизации составило 2 часа 30 минут.

Другим известным техническим решением служит способ иммобилизации фермента пероксидазы хрена на поверхности рабочего электрода с использованием реакции CuAAC [G. Rydzek, T. G. Terentyeva, A. Pakdel, D. Golberg, J. P. Hill, K. Ariga / Simultaneous

Electropolymerization and Electro-Click Functionalization for Highly Versatile Surface Platforms // American Chemical Society 5(2014) 5240-5248]. В предложенном способе на поверхности рабочего электрода из оксида индия-олова проводили реакцию электрополимеризации 4-азиданилина с одновременным протеканием реакции CuAAC, катализируемой ионами Cu(I), электровосстановленными из раствора сульфата меди в течении 450 циклов. В реакцию азид-алкинового циклоприсоединения вступали азидные группы электроосажденной пленки полимера и уницидиновая кислота, после чего посредством карбодиимидной сшивки происходила иммобилизация на электрод фермента. Существенным недостатком предложенного способа является длительность (более 4 часов) и многостадийность процедуры иммобилизации.

Недостатками вышеописанных методов и способов являются длительность и многостадийность процедуры иммобилизации, необходимость предварительного получения и очистки конъюгатов. Кроме того, присутствие ионов меди в растворе на стадии инкубирования белков может приводить к уменьшению аффинности иммунорецептора и, следовательно, ухудшить чувствительность и точность определения.

Предлагаемый способ адресной ковалентной иммобилизации белков на поверхности углеродсодержащего рабочего электрода, характеризуется погружением электрода в электрохимическую ячейку, содержащую 25% раствор винилбензилазида в диметилформамиде, наложением шести циклических разверток потенциала в диапазоне -0,5 В до -3 В для формирования на электроде пленки поливинилбензилазида, электрохимическим осаждением частиц Cu^0 в пленку поливинилбензилазида из раствора соли меди (II), перемещением электрода в водный раствор эфира пропаргил-N-гидроксисукцинимиды, наложением трех линейных разверток потенциала в диапазоне от 0 В до 1 В при перемешивании, инкубированием электрода в водной суспензии белка в течение 30 минут. Частицы Cu^0 электрохимически осаждают либо одновременно с формированием на электроде пленки поливинилбензилазида, добавляя в электрохимическую ячейку гексафторацетилацетонат меди (II), либо в заранее сформированную на электроде пленку поливинилбензилазида из водного раствора 0,01 М CuSO_4 при потенциале -1 В в течение 120 секунд.

Общая схема процедуры иммобилизации и уравнения соответствующих химических реакций приведены в приложении 1.

Электрополимеризация винилбензилазида и электрохимическое осаждение частиц меди позволяет сформировать на поверхности электрода пленку, пригодную для последующего проведения реакции CuAAC при минимальных временных, материало- и трудозатратах, поскольку катализатор – ионы Cu^{1+} генерируется и локализуется непосредственно в области протекания реакции - приэлектродном слое, винилбензилазид иммобилизован на электроде, а эфир пропаргил-N-гидроксисукцинимиды содержится в растворенном виде и непрерывно доставляется к электроду посредством перемешивания раствора. Адресность иммобилизации белка достигается за счет электрополимеризации винилбензилазида, а уменьшение числа материало- и трудозатрат - отсутствием стадии синтеза и очистки конъюгатов белков с пропаргил-N-гидроксисукцинимидом. Общее время иммобилизации не превышает 60 минут, 30 минут из которых требуется для инкубации модифицированного электрода в суспензии белка. Иммобилизация белка в предложенном способе протекает в одну стадию без непосредственного контакта с ионами меди, что способствует сохранению нативной структуры белка.

Таким образом, предлагаемое техническое решение направлено создание на

поверхности рабочего электрода адресно локализованного функционального покрытия для ковалентного связывания с белком посредством реакции CuAAC. Это позволит уменьшить число стадий и сократить длительность процедуры иммобилизации.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

Стеклоуглеродный дисковый электрод помещают в раствор диметилформамида, содержащий 25% винилбензилазида, 0,01 М гексафторацетилацетоната меди и 0,1 М перхлората лития в качестве фонового электролита. Производят шестикратную циклическую развертку потенциала в диапазоне от -0,5 В до -3 В. Модифицированный электрод помещают в водный раствор, содержащий 0,1 М эфира пропаргил-N-гидроксисукцинимиды и 0,1 М хлорида калия и производят трехкратную линейную развертку потенциала от 0 В до 1 В. После этого рабочий электрод инкубируют в растворе, содержащем антитела против карциноэмбрионального антигена в концентрации 0,1 мг/мл. О присутствии на электроде иммобилизованного белка судят по различию в величине переноса заряда на годографе электрохимического импеданса, зарегистрированном в водном растворе, содержащем 1 мМ $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, до (1) и после (2) инкубирования электрода в суспензии белка (фигура 1).

На фигуре 1 приведены годографы электрохимического импеданса, зарегистрированные на стеклоуглеродном дисковом электроде до (1) и после (2) проведения процедуры иммобилизации антител против карциноэмбрионального антигена.

Пример 2

Толсто пленочный графитсодержащий электрод помещают в раствор диметилформамида содержащий 25 % винилбензилазида и 0,1 М перхлората лития в качестве фонового электролита. Производят шестикратную циклическую развертку потенциала в диапазоне от -0,5 В до -3 В. Электрод помещают в водный раствор, содержащий 0,01 М $CuSO_4$ и выдерживают при потенциале -1 В в течение 120 секунд. Модифицированный электрод помещают в раствор, содержащий 0,1 М эфира пропаргил-N-гидроксисукцинимиды и 0,1 М хлорида калия, и производят трехкратную линейную развертку потенциала в диапазоне от 0 В до 1 В. После этого рабочий электрод инкубируют в суспензии бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 1 мг/мл. О присутствии на электроде иммобилизованного белка судят по различию в величине сопротивления переноса заряда на годографе электрохимического импеданса, зарегистрированном в водном растворе, содержащем 1 мМ $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, до (3) и после (4) инкубирования электрода в суспензии белка (фигура 2).

На фигуре 2 приведены годографы электрохимического импеданса, зарегистрированные на толсто пленочном графитсодержащем электроде до (3) и после (4) проведения процедуры иммобилизации бычьего сывороточного альбумина.

(57) Формула изобретения

1. Способ адресной ковалентной иммобилизации белков на поверхности углеродсодержащего рабочего электрода, характеризующийся погружением электрода в электрохимическую ячейку, содержащую 25%-ный раствор винилбензилазида в диметилформамиде, наложением шести циклических разверток потенциала в диапазоне -0,5 В до -3 В для формирования на электроде пленки поливинилбензилазида, электрохимическим осаждением частиц Cu^0 в пленку поливинилбензилазида из раствора соли меди (II), перемещением электрода в водный раствор эфира пропаргил-N-

гидроксисукцинимид, наложением трех линейных разверток потенциала в диапазоне от 0 В до 1 В при перемешивании, инкубированием электрода в водной суспензии белка в течение 30 минут.

5 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что частицы Cu^0 электрохимически осаждают одновременно с формированием на электроде пленки поливинилбензилазида, добавляя в электрохимическую ячейку гексафторацетилацетонат меди (II).

10 3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в заранее сформированную на электроде пленку поливинилбензилазида электрохимически осаждают частицы Cu^0 из водного раствора 0,01 М CuSO_4 при потенциале -1 В в течение 120 секунд.

15

20

25

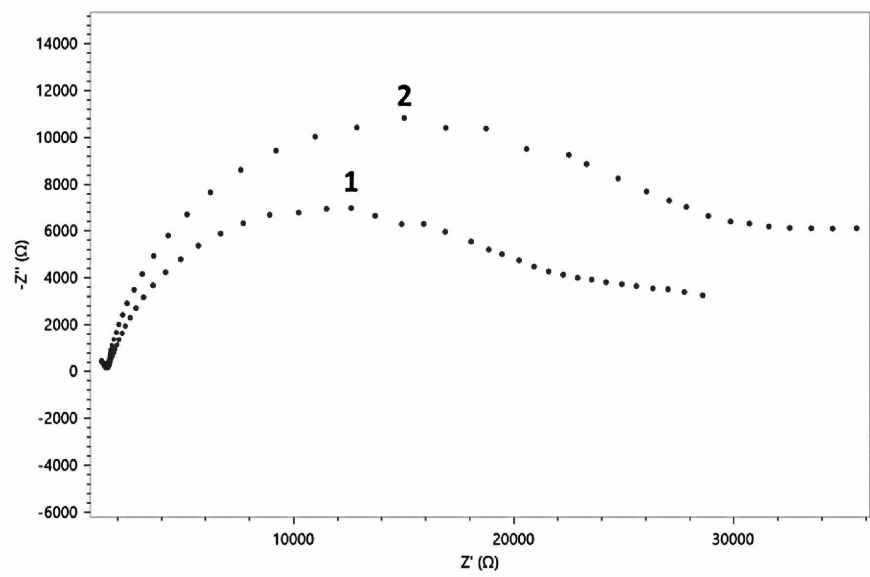
30

35

40

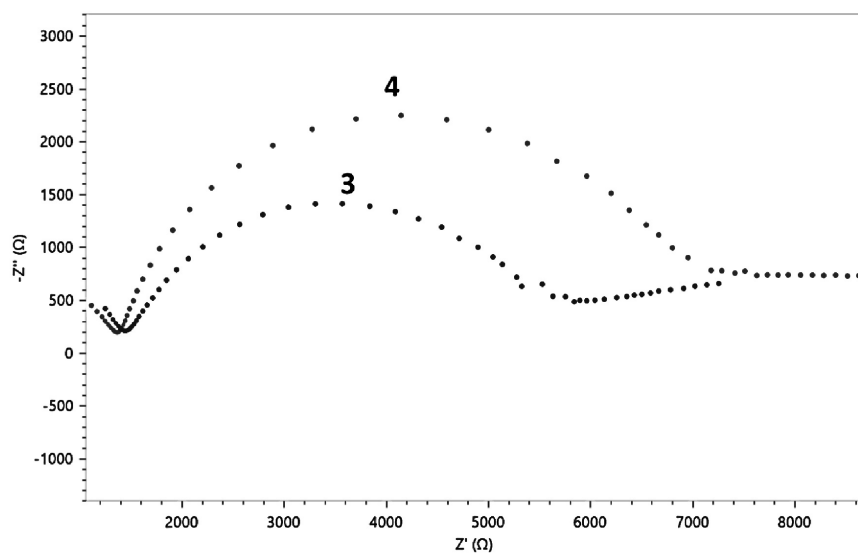
45

1



Фиг. 1

2



Фиг. 2